

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number: S57-39791

(43)Date of publication of application: 05.03.1982

(57)Abstract

An enzymatic process for producing L-carnitine is disclosed which comprises contacting a solution in a hydroxyl group donor solvent of γ -butyrobetaine, sodium2-oxoglutarate, a reducing agent and a ferrous salt as a hydroxylation catalyst with a phase comprising a spore preparation of the mold *Neurospora crassa*.

⑯ 日本国特許庁 (JP)
⑰ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭57-39791

⑯ Int. Cl.³
C 12 P 13/00
//(C 12 P 13/00
C 12 R 1/645)

識別記号
厅内整理番号

6712-4B

⑯ 公開 昭和57年(1982)3月5日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑯ L-カルニチンの製造法

⑰ 特 願 昭56-98128
⑰ 出 願 昭56(1981)6月23日
優先権主張 ⑰ 1980年6月24日 ⑰ イタリア
(I T) ⑰ 86253A/80
⑰ 発明者 クラウジオ・カバツツア
イタリア共和国00144ローマ・

ビア・マロツコ35

⑰ 出願人 シグマ-タウ・インズストリエ
・フルマチエウチケ・リウニ
テ・エツセ・ピ・ア
イタリア共和国00144ローマ・
ビアレ・シヤケスペアレ47

⑰ 代理人 弁理士 朝日奈宗太

明細書

1 発明の名称

L-カルニチンの製造法

2 特許請求の範囲

- 1 ニューロスボラ・クラツサの胞子より放出される物質からなる相に、
 - (a) ア-ブチロベタイン、
 - (b) 2-オキソグルタル酸ナトリウム、
 - (c) 還元剤および
 - (d) 第一鉄イオン源を水酸基供与性溶媒に溶かした溶液を接触させることを特徴とするL-カルニチンの製造法。
- 2 前記溶液が、(e) カタラーゼを含有してなる特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 3 前記溶媒が水、緩衝溶液、炭素原子数1～4個を有する低級脂肪族アルコールおよびそれらの混合物よりなる群から選ばれた溶媒で

ある特許請求の範囲第1項記載の製造法。

- 4 前記還元剤が亜ニチオン酸アルカリ金属塩、アスコルビン酸およびそのアルカリ金属塩よりなる群から選ばれた還元剤である特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 5 前記第一鉄イオン源が硫酸第一鉄、硫酸第一鉄アンモニウムおよびチオシアン酸第一鉄よりなる群から選ばれた第一鉄塩である特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 6 前記ニューロスボラ・クラツサが ATCC 13837、ATCC 24914、ATCC 9279 および ATCC 15514 よりなる群から選ばれた菌株である特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 7 前記相がニューロスボラ・クラツサの胞子を洗浄剤で処理せしめることによりつくられる特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 8 前記洗浄剤がトライトン X-100 である特許請求の範囲第7項記載の製造法。
- 9 前記相がニューロスボラ・クラツサの胞子を超音波崩壊器で機械的に処理することによ

りつくられる特許請求の範囲第1項記載の製造法。

5 発明の詳細な説明

本発明は、L-カルニチンの製造法に関する。さらに詳しくは、本発明はD-ブチロベタインにヒドロキシラーゼを反応させることによりL-カルニチンを酵素反応的に製造する方法に関する。

カルニチン(β -ヒドロキシ- α -トリメチル-アミノ酸)が不整中心を有し、それゆえカルニチンにはD体およびL体の2種類の立体異性体が存在することはよく知られている。

L-カルニチンは通常生体内に存在し、活性化した長鎖のフリー脂肪酸をミトコンドリアの膜から通過させるキャリヤーとしての働きを有する。ミトコンドリアの膜はアシルCoA 轉導体または長鎖脂肪酸などを通過させないが、これらがL-カルニチンでエステル化されると該膜を通過できるようになる。すなわちL-カルニ

171～176(1960)およびアレクサンダー(Alexander)らの1958年ブルジエにおける第6回「体液中におけるタンパク質」に関する討論会要旨集306～310頁("Protides in the Biological Fluids", 6th Colloquium, Bruges, 1958, 306～310)参照)。また米国特許第3830931号明細書にはカルニチンのラセミ体の投与によってしばしば心筋症の収縮性やうつ血症の心臓疾患における心筋収縮の律動性が改善されることが開示されている。さらに米国特許第3810994号明細書には肥満症の治療に対してカルニチンのラセミ体が効果を有することが開示されている。

しかし最近、少なくともいくつかの治療学的使用に対しては左旋性の異性体であるL-カルニチンのみを使用する方が効果的であることが次第に明らかにされ、その重要性に対する関心が高まりつつある。実際、D-カルニチンはカルニチン-アセチル-トランスファラーゼ(CAT)やカルニチン-バルミチル-トランスファラーゼ(PTO)などのカルニチン結合酵素(carnitine

チルCoAをミトコンドリアからその外側(そこで長鎖脂肪酸が合成される)へ移送させる働きの2つのキャリヤーとしての機能を有する。なおミクロソームにおいてアセチルCoAはコレステロールおよび脂肪酸を合成するために使われる。

カルニチンは左旋性の異性体(L-カルニチン)のみが天然物の形態(実際、牛乳類の組織に関するかぎりD-カルニチンは検出されていない)であるにもかかわらず、D体およびL体の混合物(ラセミ体)のカルニチンが長年にわたり種々の症候に対して用いられてきた。たとえばヨーロッパにおいてはカルニチンのラセミ体は食欲増進剤に製剤されて販売されており、またそれが子供の成長の速度を促進する効果を有することが報告されている(たとえばボルニケ(Borniche)らの論文(Clinic Chemica Acta, 5,

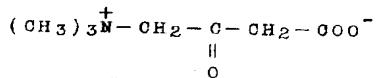
-linked enzyme)に対する競争的抗動質(competitive inhibitor)であることが明らかにされてきている。さらには、D-カルニチンが心臓組織におけるL-カルニチンの濃度を不足させるという報告も最近なされている。したがつて心臓症や脂血症に対する薬物的治療に際しては、カルニチンのL体のみを患者に投与するのが本来である。

カルニチンを工業的スケールで製造するための製造方法が数多く提案されてきた。カルニチンを化学的な合成法によって製造したばあい、カルニチンはD体およびL体のラセミ混合物としてのみうることが可能である。したがつてL-カルニチンをうるためにラセミ体を光学分割しなければならない。

その光学分割の方法のなかでも代表的なものはベルギー特許第660039号明細書に開示されているD,L-カルニチンアミド塩酸塩を出発物質として用いる方法である。その方法はD,L-カルニチンアミド塩酸塩にD-シヨウノウ酸(D-camphoric acid)を作用させて相当するD-シ

ヨウノウ酸エステルとしたのち、アルコールを溶媒として用いて分別結晶せしめ、最初に沈殿してくる固体からL体をうることからなつてゐる。

この方法では、D,L-カルニチンアミドのD-シヨウノウ酸エステルを形成せしめるためにD-シヨウノウ酸はアンモニアを用いて相当するアンモニウム塩に変換したのち、生成したD-シヨウノウ酸のアンモニウム塩をつぎに硝酸銀を加えることによつてD-シヨウノウ酸の銀塩に変換させる必要がある。カルニチンアミドは塩酸塩の形になつてゐるので、D-シヨウノウ酸の銀塩と反応させたばあいその塩素イオンは硝酸銀となつて沈殿するため大部分を除去できる。したがつてこの方法は銀化合物の使用が必要であるため非常に高価であり、また工業的スケールで行なうばあい生成した多量の硝酸銀により反応液がいちじるしく暗色化されることを避けるためにほとんどの製造工程が遮光下で行なわれなければならないという欠点がある。



で表わされるデヒドロカルニチンを不整還元することを特徴としている。なお、カルニチン脱水素酵素はシュードモナス属のバクテリアから単離される。

製薬学上の見地からは、この製造法はバクテリアを利用した種々の製造法と同様ないくつかの欠点がある。それらの欠点をつぎにあげる。

- (1) 該方法の酵素源は高価であり、複雑な精製工程によつて注意深く精製して用いなければならず、とくに工業的スケールで精製を行なうばあいにはその欠点が顕著になる。
- (2) 製造されるL-カルニチンも同様に充分な精製が必要であり、毒性を有し非衛生的なバクテリアの代謝産物やその他の汚染物から分離しなければならない。
- (3) NADH(高価な反応体)がバクテリア細胞壁を通過しないので無傷のバクテリアを用いたばあい、NADHは反応を活性化することができない。

それに加えて、D,L-カルニチンアミドのD-シヨウノウ酸エステルが銀イオンによつて汚染されてしまうという欠点がある。さらには、アルコール溶媒から分別結晶によつてL-カルニチンアミドのD-シヨウノウ酸エステルをえたのち、最終的にL-カルニチンに変換するまでに数工程を要する。

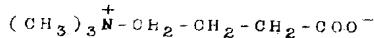
ごく最近のフランス特許出願第7722183号明細書にL-カルニチンのみを選択的に合成する方法が開示されている。その方法は、

- (a)カルニチン脱水素化酵素(カルニチンデヒドロゲナーゼ)、
- (b)たとえばニコチンアミドアデニジヌクレオチド(NAD)などに代表される脱水素化酵素の還元に使用される補酵素および
- (c)酸化型であるNADをその還元型、すなわちNADHに還元するのに好適な化学的または酵素学的な試薬

を用いて、式：

本発明者は反応に用いる酵素源としてバクテリア以外のものを用いてL-カルニチンを選択的に製造する方法を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒドロキシラーゼ酵素を有するニューロスボラ・クラツサ(*Neurospora crassa*)の胞子が水酸基供与性の溶媒中2-オキソグルタル酸ナトリウム、第一鉄イオンおよび還元剤の存在下でアーブチロベタインと接触したばあい、アーブチロベタインがほとんど純粋なL-カルニチンのみに選択的に変換されることを見出し、本発明を完成するにいたつた。

式：



で表わされるアーブチロベタインは公知物質であり、化学的な合成法によつてたやすく調製することができる(アーブチロベタインの製造法は、たとえばCan.J.Chem.、54、3310-3311、(1976)を参照)。

生体中においてアーブチロベタインがL-カルニチンにヒドロキシル化されることは知られ

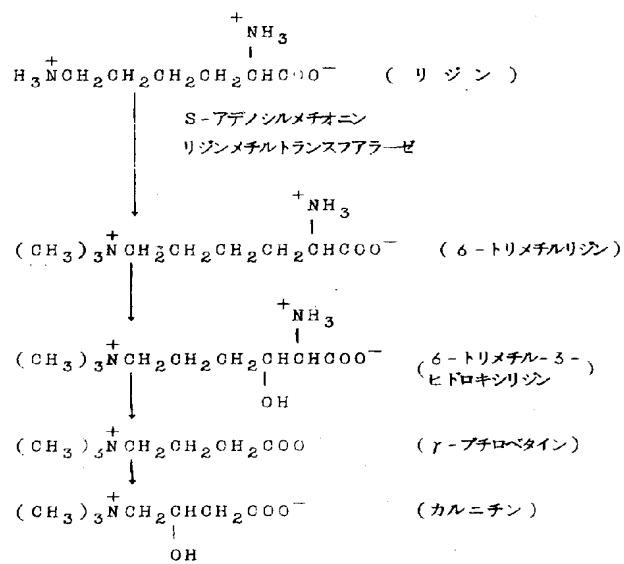
(Biochemistry, 6, (5), 1271~1282 (1967) 参照)。

しかしながら、ニューロスボラ・クラツサの胞子中に γ -ブチロベタインのヒドロキシラーゼ酵素が存在し、その胞子を物理化学的に (chemico-physically) または機械的に処理することによってその構造が一部変化したヒドロキシラーゼが放出され、それが γ -ブチロベタインの変換に用いられるることは知られていない。

本発明は γ -ブチロベタインにヒドロキシラーゼ酵素を反応させることによる L-カルニチンの製造法、さらに詳しくは、ニューロスボラ・クラツサの胞子から放出された物質からなる相に (a) γ -ブチロベタイン、(b) 2-オキソグルタル酸ナトリウム、(c) 還元剤および (d) ヒドロキシル化の触媒である第一鉄イオンの水酸基供与性溶媒の溶液を接触させることを特徴とする L-カルニチンの製造法を提供することを目的とする。

相に含まれる胞子から放出される物質は胞子を洗浄剤 (detergent) で物理化学的に処理する

ている。実際、ここ 2~3 年の研究によつて、カルニチンがつぎの機構にしたがつて生合成されることが明確にされてきている。



またラットの肝臓から単離され、部分的に精製された溶解性タンパクのフラクションによつて γ -ブチロベタインが L-カルニチンにヒドロキシル化されることも報告されている。

L-カルニチンの収率をさらに向上させるために前記溶液に (e) カタラーゼを加えることもできる。

γ -ブチロベタイン、2-オキソグルタル酸ナトリウム、還元剤およびヒドロキシル化の触媒を溶解させるための溶媒は水、緩衝液、炭素原子数 1~4 個を有する低級アルコールおよびそれらの混合物よりなる群から選ばれるが、なかんづく pH 7 のリン酸カリウム緩衝液が好ましい。

本発明に用いる還元剤は第二鉄イオン (Fe^{3+}) を第一鉄イオン (Fe^{2+}) に還元するのに好適な各種の還元剤が用いられる。第一鉄イオンはニューロスボラ・クラツサの胞子中に含まれているヒドロキシラーゼ酵素による γ -ブチロベタインのヒドロキシル化反応の触媒として働く。したがつて第二鉄イオンが生成しても、そのものはただちに第一鉄イオンに変換される。これらの還元剤はとくに限定されないが、好ましくは

アルカリ金属の亜二チオン酸塩、アスコルビン酸またはその金属塩などがあげられる。

第一鉄イオン源としてはヒドロキシラーゼ酵素の活性を失活しないようなアニオン部を有する水溶性の鉄塩が用いられる。好ましい第一鉄源としては硫酸第一鉄 (FeSO_4)、硫酸第一鉄アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) またはチオシアニン酸第一鉄 ($\text{Fe}(\text{SCN})_2$) などの第一鉄塩があげられるが、なかんづく硫酸第一鉄が好ましい。

あらゆる菌株のニューロスボラ・クラツサの胞子が本発明に用いられるが、とくに ATCC9279、ATCC13837、ATCC15514 または ATCC24924 の菌株が本発明には好ましい。ニューロスボラ・クラツサの胞子の増殖、単離および精製は微生物学のごく普通の専門家が有する一般的な技術によつて簡便に行ないうるが、好ましくは、エム・コルタット (M. Cortat) らの論文 ("Cnidiation of Neurospora Crassa in Submerged Culture without Mycelial Phase", Arch. Microbiol., 95, 305~309 (1974) 参照) に開示されている。

方法にしたがうのがよい。

かくして増殖し、単離された胞子はその酵素活性を失なつたりまたはほとんど減少してしまつたりすることなしに保存される。胞子はトライトン X-100 (Triton X-100) などの洗浄剤で処理するかまたは超音波崩壊器などの機械的手段によつて処理される。この処理によりヒドロキシラーゼ酵素が放出され、そのものからヒドロキシラーゼ酵素を含有する相がえられる。該相は処理された胞子の残渣物を含有した状態または含有していない状態で本発明に用いられる。

つぎに実施例をあげて本発明を説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

実施例

5～30pモル/m²の酵素濃度に調節した胞子処理物質含有相、 α -ブチロベタイン 2～14mmol、硫酸第一鉄アンモニウム 0.6～2mmol、アスコルビン酸ナトリウム 10～14mmol、2-オキソグル酸ナトリウム 1.4～3mmol およびカタラーゼをリソソルブン (Ritobal) で処理した。

本発明の方法は、従来なされてきた方法にくらべていくつかの点ですぐれている。それらの長所を以下にあげる。

(1) 従来の化学的な方法ではカルニチンは D 体および L 体のラセミ混合物としてえられるのに対し、本発明の方法によれば L-カルニチンのみを選択的にかつ高収率 (約 80%) でうることができる。そのためラセミ混合物を左旋性と右旋性の物質に光学分割し、ついで後者を再びラセミ化し、さらに光学分割に供する必要がない。

(2) 従来のバクテリアを酵素源として用いる方法にくらべて、本発明の方法は使用する酵素源ならびに生成した L-カルニチンを精製するときのわずらわしさがなく、しかも安価である。またヒドロキシラーゼ酵素を胞子処理物から単離する必要がなく、安全に操作が行ないえ、えられる L-カルニチンはほとんど純粋な結晶である。いいかえれば、従来のバクテリアを使用する方法において不可欠であ

セをリン酸カリウム 14mmol の緩衝液 (pH7) にその濃度が 1～1.4% となるように加えて調製した溶液を反応容器に添加した。この混合物を 37°C で 30～60 分間培養したのち、反応液を 0.7 ミリボアのフィルターで済過した。

済液中の L-カルニチンはデビッド・ジェイ・ピアソン (David J. Pearson) らの方法で分析した ("Method of Enzymatic Analysis", 第 4 卷 (第 2 版)、1974 年、1758 頁、Academic Press Inc. 参照)。その分析値から L-カルニチンが約 80% の収率で生成していることがわかつた。

この済液を常法により処理してえられる有機物残渣は未反応の α -ブチロベタインおよび L-カルチニンの混合物であつた。該混合物はゲラン・リントシュテット (Göran Lindstedt) が開示している方法 (Biochemistry, 6, (5), 1271～1281 (1967) 参照) によつて処理し L-カルニチンを単離した。

えられた L-カルニチンは生体系から抽出される L-カルチニンと同じ光学的性質を示した。

つたバクテリアおよびバクテリア代謝産物などの汚染物質を L-カルニチンから除去する必要がない。

(3) ニューロスボラ・クラツサの胞子は大量に製造することができ、しかも乾燥した形で保存できる。さらにそれらは、ほとんどその酵素活性を失なうことなく必要なときに取り出して用いることができる。

特許出願人 シグマ-タウ・インスツトリエ・ファルマチエウチケ・リウニテ・エツセ・ビ・ア

代理人弁理士 朝日奈宗太